

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 61-182578

(43)Date of publication of application : 15.08.1986

(51)Int.Cl.

G01N 33/543
A61K 39/00
C12Q 1/00
G01N 33/569

(21)Application number : 60-024223

(71)Applicant : HITACHI CHEM CO LTD

(22)Date of filing : 08.02.1985

(72)Inventor : TANNO KAZUNOBU
IJIMA HIROMI

(54) METHOD AND REAGENT FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF ANTI -STREPTOLYSIN O ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To improve the accuracy of quantitative determination by mixing serum and the latex of an insoluble carrier which is sensitized with streptolysin O and has $<0.2 \mu m$ grain size in such a manner that the final concn. attains $<0.05wt\%$, inducing a latex agglutination reaction by the antigen-antibody reaction and measuring light absorbency at 530W600nm wavelength.

CONSTITUTION: The serum and the latex of the insoluble carrier which is sensitized with the streptolysin and has about $0.05W0.2 \mu m$ grain size are mixed with a phosphoric acid buffer soln., etc. as a medium in such a manner that the final concn. of the insoluble carrier attains $<0.05wt\%$ to prepare a mixed liquid. The mixed liquid induces the latex agglutination reaction by the antigen- antibody reaction and the light absorbency of the reaction liquid after the reaction is measured by using the adequate wavelength of 530W600nm. The optical path length of the cell in the absorbency measurement is preferably about 5W10mm.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(4)

ストレプトリジン O の定量法

7-10

⑨ 日本国特許庁 (J P)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報 (A)

昭61-182578

⑫ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑬ 公開 昭和61年(1986)8月15日

G 01 N 33/543
A 61 K 39/00
C 12 Q 1/00
G 01 N 33/569

G-7906-2G
8214-4C
8213-4B
7906-2G

審査請求 未請求 発明の数 2 (全6頁)

⑭ 発明の名称 抗ストレプトリジン O 抗体の定量法及びその定量試薬

⑮ 特 願 昭60-24223

⑯ 出 願 昭60(1985)2月8日

⑰ 発 明 者 丹 野 和 信 日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

⑱ 発 明 者 飯 嶋 裕 己 日立市東町4丁目13番1号 日立化成工業株式会社茨城研究所内

⑲ 出 願 人 日立化成工業株式会社 東京都新宿区西新宿2丁目1番1号

⑳ 代 理 人 弁理士 若 林 邦 彦

明 細 書

1. 発明の名称

抗ストレプトリジン O 抗体の定量法及びその定量試薬

2. 特許請求の範囲

1. 血清とストレプトリジン O を感作した粒径 0.2 μ m 未満の不溶性担体のラテックスとを該不溶性担体の最終濃度が 0.05 重量% 未満となるように混合して混合液とし、抗原-抗体反応によるラテックス凝集反応を起こさせて、530~600 nm の波長で吸光度を測定し、この測定値から血清中の抗ストレプトリジン O 抗体を定量することを特徴とする抗ストレプトリジン O 抗体の定量法。

2. ラテックス凝集反応を5秒~15分間、恒温で行なう特許請求の範囲第1項記載の抗ストレプトリジン O 抗体の定量法。

3. 不溶性担体が診断用ポリスチレン系ラテックス粒子である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の抗ストレプトリジン O 抗体の定量法。

4. 吸光度測定について、ラテックス凝集反応

の進行に伴う吸光度の増加を測定する特許請求の範囲第1項、第2項又は第3項記載の抗ストレプトリジン O 抗体の定量法。

5. ストレプトリジン O を感作した粒径 0.2 μ m 未満の不溶性担体のラテックスからなる抗ストレプトリジン O 抗体定量試薬。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は血清中の抗ストレプトリジン O 抗体 (ASO) の迅速な定量法に関し、特にラテックス凝集比濁法を利用する定量法及びその定量試薬に関する。

(従来の技術)

溶レン菌はショック紅熱、咽頭炎、化膿性疾患、急性腎炎、リウマチ熱などの起因菌として知られている。溶レン菌には種々の抗原物質が存在するので、感染により多くの抗体が産生される。溶レン菌の抗原物質はストレプトリジン D、デオキシリボヌクレアーゼ B、ヒアルロニダーゼ、ニコチンアミドアデニンジヌクレオチダーゼ、ストレプ

トキナーゼなどがある。

各種抗原物質と血清学的検査で検出できる抗体を表1に示す。

表1 溶レン菌の抗原物質と抗体

菌体外毒素	対応する抗体
ストレプトリジンO	ASO
デオキシリボヌクレアーゼB	ADN-B
ヒアルロニダーゼ	AH
ニコチンアミドアデニンシクロオキシダーゼ	ANAD
ストレプトキナーゼ	ASK

菌体外毒素に対する抗体は感染早期から産生されるため、ごく最近溶レン菌の感染があつたか否かの診断に本抗体の存在が重要な意義を有することが知られている。もつとも代表的な抗体として抗ストレプトリジンO抗体(ASO)があげられ、広く日常検査で行なわれている。ASO価の測定方法を表2に示した。測定法は溶血阻止反応と受身凝集反応の二つの異なる原理に分かれる。前者はASOの毒素中和活性を、後者はASOの沈降素

クリーニング試験にしか使用できない欠点があつた。

(問題点を解決するための手段)

第1の発明は、血清とSLOを感作した粒径0.2 μ m未満の不溶性担体のラテックスとを該不溶性担体の最終濃度が0.05重量%未満となるように混合して混合液とし、抗原-抗体反応によるラテックス凝集反応を起こさせて、530~600nmの波長で吸光度を測定し、この測定値から血清中のASOを定量することを特徴とするASOの定量法に関する。

第2の発明は、第1の発明に使用されるASO定量試薬に関し、該定量試薬は、SLOを感作した粒径0.2 μ m未満の不溶性担体のラテックスからなる。

上記不溶性担体のラテックスとは、~~該不溶性担体~~^{SLO}を感作した不溶性担体を適当な媒体に分散させたラテックスである。該不溶性担体は、粒径が0.2 μ m未満である。この粒径が0.2 μ m以上では、吸光度の測定が困難になる。該不溶性担体と

活性を利用した検査法である。

表2 ASO価測定法

溶血阻止反応	受身凝集反応
Rantz-Randall 法 マイクロタイター法	ラテックス粒子を用いる方法 微生物担体に吸着したものを 用いる方法

(発明が解決しようとする問題点)

これらの検査法のうち前者の代表的な方法であるランツ-ランダー(Rantz-Randall) 法はASOがストレプトリジンO (以下SLOと略す) の溶血作用を中和することを利用した半定量法で、患者血清を種々の倍数で希釈し、これを一定濃度のSLO、赤血球と反応させ、この時の溶血阻止希釈倍数を抗体量とする方法である。本法は血清希釈が非常に煩雑で、手間がかかり、また検査のために新鮮血球を常時入手する必要があること、SLOも酸化に不安定で溶解後一定時間内に使用する必要があり、脂質の影響を受けやすいなどの問題があつた。

また、既販のラテックス凝集法は定性法で、ス

しては、公知の診断用ポリスチレン系ラテックス粒子などがある。なか、不溶性担体は、粒径が0.05 μ m以上であるのが好ましい。また、上記媒体としては、リン酸緩衝液等が好ましく、媒体には、牛血清アルブミン、塩濃度調整のためにNaCl等の塩などを含むのが好ましい。不溶性担体は、媒体中に、適宜の濃度で分散せられるが、0.1~0.5重量%が好ましく、特に0.4重量%前後が好ましい。

血清と上記ラテックスとは混合され、これにより、抗原-抗体反応によるラテックス凝集反応が起こる。この混合時に、さらに、リン酸緩衝液等の希釈液を混合し、適当なラテックス濃度にされる。混合液は、混合初期に攪拌され、この後は、静置される。この混合液の濃度(ラテックス凝集反応中の混合液における不溶性担体の最終濃度)は、0.05重量%未満にされ、また、0.01重量%以上であるのが好ましい。最終濃度が0.05重量%以上であると吸光度の測定が困難になり、小さすぎると凝集反応が不十分になりやすい。

また、上記反応は、25～37℃で行なうのが好ましく、反応中は恒温にするのが好ましい。この範囲をはずれると抗原-抗体反応が不安定になりやすい。さらに、この反応は、5秒～15分間行なわれるのが好ましく、特に10秒から5分間行なわれるのが好ましい。5秒未満では、上記反応が不十分であり、吸光度から~~ASD~~を定量するのが困難になり、15分を超えると短時間測定の間所が減じる。

上記ラテックス凝集反応後、反応液の吸光度が好ましくは530～600nmの適切な波長を選択して測定される。

また、吸光度測定におけるセルの光路長は、5～10mmであるのが好ましい。

以上の測定は、抗原-抗体反応開始後、少なくとも2回混合液の吸光度を測定し、その間の吸光度の増加分または単位時間当りの増加分（すなわち、抗原-抗体反応の進行に伴う吸光度の増加分、 ΔA_T ）を求めるのが好ましい。

一方、上記混合液において、血清の代わりに水

上記1)希釈液に溶レン菌から抽出精製したストレプトリジンOを感作した粒径0.2μ未満のポリスチレンラテックスを分散させた試液（ラテックス濃度0.4%）

II) ASO価標準血清

国立予防衛生試験所法に準じ、トッド(Todd)単位で表示。

2) 測定方法

生理食塩水3μl、希釈液（試液1、R1と略す）350μlを混合し、37℃で適時、保持した後、ラテックス試薬（試液2、R2と略す）50μlを添加攪拌し、この後、1分後及び3分後の530nm～600nmの間の適切な波長での吸光度変化を測定する。この間の吸光度の増加分から単位時間当りの増加分を求め、これを試薬ブランクの吸光度変化(ΔABS_{AB})とする。次に検体血清3μl、希釈液350μlを混合し、37℃で適時保持した後、ラテックス試薬50μlを添加攪拌し、試薬ブランク測定と同一条件で吸光度変化をみる。これを被験液の吸光度変化(ΔABS_T)と

又は生理食塩水を使用して得た液を同様に吸光度の増加分または単位時間当りの増加分(ΔA_{AB})を求めておく。

上記 ΔA_T 及び ΔA_{AB} からASOに関する吸光度 ΔA_{ASO} が次の式から求められる。

$$\Delta A_{ASO} = \Delta A_T - \Delta A_{AB}$$

ΔA_{ASO} から $\overset{ASO}{\Delta A_{ASO}}$ の定量は、ASO価標準血清を用いて ΔA_{ASO} とASO価(todd:トッド)の検量線を上記した測定方法により作成しておき、上記算出吸光度増加分(ΔA_{ASO})に該当するASO価を検量線から求めることによつて達成される。

(実施例)

次に試薬、測定方法、実験結果などに関連して本発明を具体的に説明する。以下、%は重量%を意味する。

1) 試薬

I) 希釈液

0.15M NaCl及び0.1%牛血清アルブミン含有0.05Mリン酸緩衝液(pH6.50)

II) ラテックス試薬

する。

検体血清の吸光度変化(ΔABS_{ASO})を式

$$\Delta ABS_{ASO} = \Delta ABS_T - \Delta ABS_{AB}$$

から算出する。一方、上記と同様に検体血清の代わりにASO価標準血清を用いて吸光度変化とASO価(Todd単位)の検量線を作成し、上記算出吸光度変化に該当するASO価を上記検量線から求める。測定は日立自動分析装置705形及び736形（以下、日立705形及び736形と略す）を用い、上記測定原理を適用した。

日立705形及び736形（共に光路長6mm）では分析法プログラムのレートアッセイ法を使用すると自動的に装置が本測定法にもとづいて演算し、測定結果を算出する。反応温度は25～37℃、測定波長は530～600nmの間の適切な波長を選択し、一波長を採用する。

3) 実験結果

I) 検量線及び直線性

250トッド単位前後のASO価標準血清を対照にASO陽性検体（血清）の希釈系列を調製し、

各希釈系列について3回、上記測定法により測定し、測定結果の平均値をプロットしたのが第1図である。400トッド単位強まで良好な直線性が得られた。

II) 抗体過剰による地帯現象の有無

高ASO陽性検体(血清)で希釈系列を作成し、上記測定方法により測定して抗体過剰による地帯現象の有無を検討した。この結果を第2図に示す。抗体過剰による地帯現象が生ずれば、高値で測定値が低下するが、第2図の結果からはこういった現象は認められず、打出し値は600トッド単位強でプラトーになった。

III) 共存物質の影響

アスコルビン酸、ビリルビン、乳び(イントラファット使用)、溶血(ヘモグロビン使用)を高ASO陽性検体(血清)に添加して上記測定法により測定し、これら共存物質の影響を検討した。これら共存物質のASO価測定値におよぼす影響は第3～6図に示したように認められなかった。この事実は一レーザー比ろう法で必要とされる検体

血清の特別な前処理が本発明では不要であることを如実に示している。

IV) 本法とマイクロタイター法との相関

栄研化学製マイクロタイター法との相関を示した。第7図に示すように相関係数 $r=0.897$ と良好な結果が得られた。第7図中、数値は、各種内に入つた回数を示す。

(発明の効果)

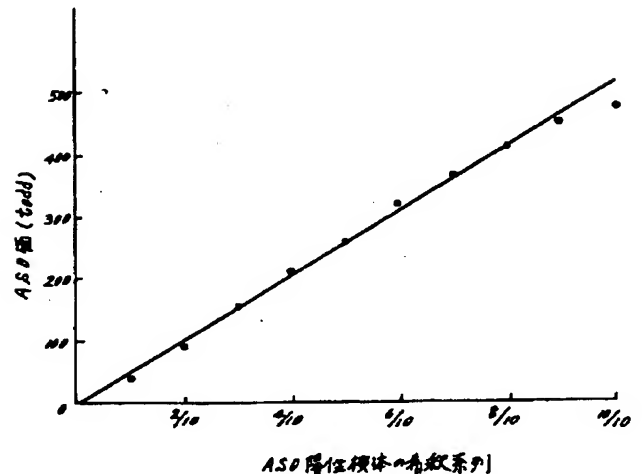
本発明により、血清中のASOを迅速に精度良く定量することができ、そのための定量試薬を提供することができる。

4. 図面の簡単な説明

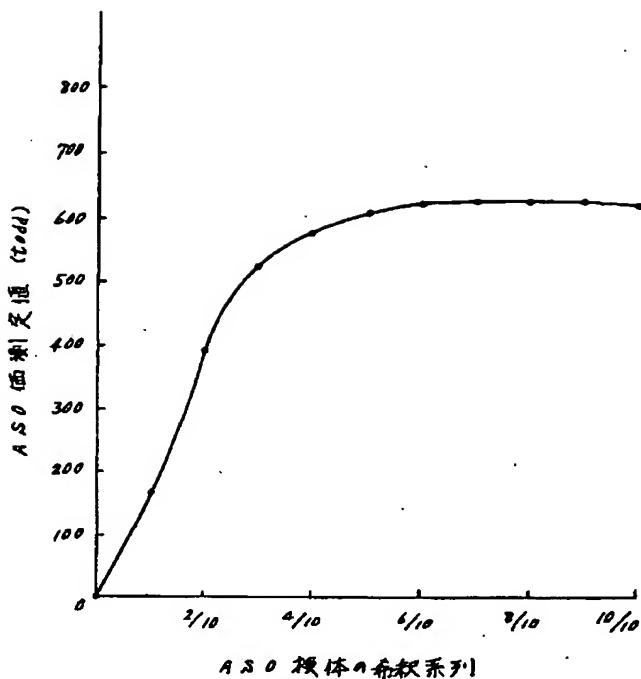
第1図は実施例で求めた検量線、第2図は高ASO陽性検体(血清)とその希釈系列の本発明(第1の発明)による測定結果を示すグラフ、第3図、第4図、第5図及び第6図は各々ASO陽性検体(血清)に、イントラファット、ビリルビン、ヘモグロビン及びアスコルビン酸を添加して本発明(第1の発明)による測定結果を示すグラフ並びに第7図は本発明(第1の発明)とマイク

ロタイター法との相関関係を示す図である。

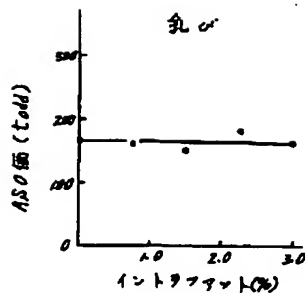
代理人 弁理士 若 林 邦 彦



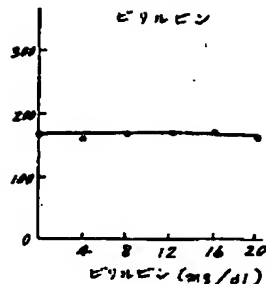
第1図



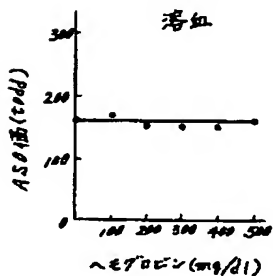
第 2 図



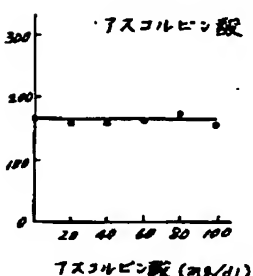
第 3 図



第 4 図



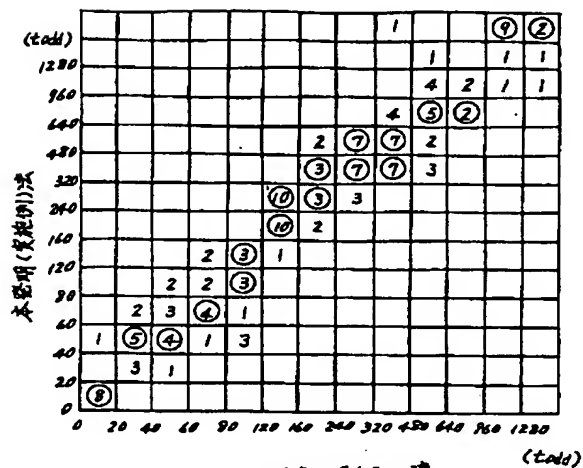
第 5 図



第 6 図

手続補正書(自発)

昭和 61 年 5 月 6 日



マ 4 7 0 7 4 7 - 法

第 7 図

特許庁長官殿

1. 事件の表示

昭和 60 年 特 許 願 第 2 4 2 2 3 号

2. 発 明 の 名 称

抗ストレプトリジンO抗体の定量法及びその定量試薬

3. 補 正 を す る 者

事件との関係 特許出願人
名 称 (445) 日立化成工業株式会社

4. 代 理 人

103
〒4000
東京都新宿区西新宿二丁目1番1号
日立化成工業株式会社内
電話東京 340-1111 (大代販)
氏 名 (7105) 弁護士 若 林 邦 彦

5. 補 正 の 対 象

明細書の特許請求の範囲及び発明の詳細な説明の欄

6. 補 正 の 内 容

明細書を次のとおり補正します。

(1) 特許請求の範囲の欄を別紙のとおり補正します。

(2) 第5頁第8～9行目に、

「530～600 nmの波長で」とあるのを削除します。

(3) 第7頁第11行目に、

「好ましくは530～600 nm」とあるのを、

「ラテックス凝集反応における吸光度測定に一般に使用される波長から、好ましくは530～600 nm」と訂正します。

5. ストレプトリジンOを感作した粒径0.2 μm未満の不溶性担体のラテックスからなる抗ストレプトリジンO抗体定量試薬。」

「特許請求の範囲

1. 血清とストレプトリジンOを感作した粒径0.2 μm未満の不溶性担体のラテックスとを該不溶性担体の最終濃度が0.05重量%未満となるように混合して混合液とし、抗原-抗体反応によるラテックス凝集反応を起こさせて、吸光度を測定し、この測定値から血清中の抗ストレプトリジンO抗体を定量することを特徴とする抗ストレプトリジンO抗体の定量法。

2. ラテックス凝集反応を5秒～15分間、恒温で行なり特許請求の範囲第1項記載の抗ストレプトリジンO抗体の定量法。

3. 不溶性担体が診断用ポリスチレン系ラテックス粒子である特許請求の範囲第1項又は第2項記載の抗ストレプトリジンO抗体の定量法。

4. 吸光度測定について、ラテックス凝集反応の進行に伴う吸光度の増加を測定する特許請求の範囲第1項、第2項又は第3項記載の抗ストレプトリジンO抗体の定量法。